

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-505910

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月9日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/543

21/27

33/547

識別記号

5 9 5

F I

G 0 1 N 33/543

21/27

33/547

5 9 5

C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願平8-510606  
(86) (22) 出願日 平成7年(1995) 9月21日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 3月24日  
(86) 国際出願番号 PCT/EP 95/03731  
(87) 国際公開番号 WO 96/09547  
(87) 国際公開日 平成8年(1996) 3月28日  
(31) 優先権主張番号 P 4 4 3 3 9 8 0 . 1  
(32) 優先日 1994年9月23日  
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, BR, CA, CN, J P, KR, MX, NZ, PL, RU, US

(71) 出願人 ベーリンガー インゲルハイム インター  
ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ  
シュレンクテル ハフツング  
ドイツ連邦共和国 デー55216 インゲル  
ハイム アム ライン ポストファッハ  
200  
(72) 発明者 シュタインライン ペーター  
オーストリア アー1020 ウィーン レン  
ブラントシュトラッセ 10-4  
(72) 発明者 ツァウナー ヴォルフガング  
オーストリア アー1030 ウィーン レン  
ヴェーク 72-2-14  
(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴を使用する生物分子の相互作用の研究手法

(57) 【要約】

本発明は表面プラズモン共鳴 (SPR) により生物分子の間の相互作用を研究するための方法、再生し得るバイオセンサーユニット及びその研究に適したキットに関する。試薬の一種である (ポリ) ペプチドが金属キレートによりバイオセンサーユニットの表面にカップリングされる。ヒスチジン基を含むアフィニティーペプチドを有するタンパク質が結合し得るニトリロトリ酢酸誘導体がキレート形成剤として使用されることが好ましい。

**【特許請求の範囲】**

1. 相互作用により励起される表面プラズモン共鳴を電磁放射線に透過性であり、かつ異なる屈折率のものである二つの媒体（低い屈折率の媒体は（ポリ）ペプチドが固定された形態で存在し、反応パートナーと接触される水性媒体である）の界面で金属層中で測定する（ポリ）ペプチドと反応パートナーの相互作用の研究方法であって、（ポリ）ペプチドを金属キレートにより固定することを特徴とする方法。
2. 水性媒体が生体適合性の多孔質マトリックス、特にヒドロゲルであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。
3. キレート剤がヒドロゲルにより有される反応性基によりバイオセンサーユニットの表面に結合されることを特徴とする請求の範囲第2項に記載の方法。
4. ヒドロゲルが多糖、例えば、デキストラン、アガロース、ヤハズツノマタ、アルギン酸塩、澱粉、セルロースまたはこれらの誘導体、または水膨潤性有機ポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドもしくはポリエチレングリコールを含む群から選ばれることを特徴とする請求の範囲第2項または第3項に記載の方法。
5. ヒドロゲルがデキストランであることを特徴とする請求の範囲第4項に記載の方法。
6. デキストランが反応性基としてカルボキシメチル基を有することを特徴とする請求の範囲第5項に記載の方法。
7. （ポリ）ペプチドが、その生物活性セグメントに加えて、少なくとも一つのヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドを有する融合（ポリ）ペプチドであり、かつキレート剤がイミノジ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第1項～第6項の一つに記載の方法。
8. （ポリ）ペプチドが少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドを有し、かつキレート剤が一般式 $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$ （式中、Rは型 $(CH_2)_n$ -のアルキレン基（これは置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい）を表してもよく、但し、その置換基がキレート剤

の機能に対して有害な作用を有しないことを条件とし、かつ  $n$  は整数 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 を表し、そのアルキレン基が十分に大きい場合には、それはおそらくまた一つ以上のアルケン部分構造またはアルキン部分構造を含んでいてもよく、または  $R$  は芳香族ブリッジ員 [これは一つ以上の単核芳香族化合物または多核芳香族化合物 (これは必要によりまた芳香族複素環であってもよい) からつくられていてもよい] を表してもよく、または  $R$  はアラルキルブリッジ員 (その芳香族部分は直接に、または型  $(CH_2)_n-$  (式中、 $n$  は整数 1、2、3、4 または 5 を表してもよい) のアルキル基を介して  $Y$  に結合されていてもよく、またはカルボキシル基に隣接する  $\alpha$ -C 原子に結合されていてもよく、かつ  $Y$  は反応性基、特に  $NH_2$  基または  $SH$  基である)

のニトリロトリ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第 7 項に記載の方法。

9. ニトリロトリ酢酸誘導体が  $N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)$  イミノジ酢酸であることを特徴とする請求の範囲第 8 項に記載の方法。

10. (ポリ) ペプチドが少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドを有し、かつキレート剤が一般式  $Y-R_1-CH(COOH)-N(R_2CHCOOH)_2$  (式中、 $R_1$  は請求の範囲第 8 項に  $R$  について示された意味を有する基であり、かつ  $R_2$  は型  $CH_3(CH_2)_n-$  (これは、例えば、 $OH$  もしくは  $Cl$  で置換されていてもよく、または置換されていなくてもよく、かつ  $n$  は整数 1、2、3、4 または 5 を表してもよい) のアルキル基であってもよく、または  $R_2$  は分岐アルキル基、例えば、イソプロピル、 $t$ -ブチルまたはイソブチルであってもよく、または  $R_2$  は請求の範囲第 8 項に  $R$  について示された意味を有する芳香族ブリッジ員であってもよく、かつ  $Y$  は反応性基、特に  $NH_2$  基または  $SH$  基である)

のニトリロトリ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第 7 項に記載の方法。

11. ニトリロトリ酢酸誘導体が  $N\alpha, N\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2,6-ジアミノヘキサン酸であることを特徴とする請求の範囲第 10 項に記載の方法。

12. キレート剤が遷移金属イオン、特に第四周期の遷移金属イオンで錯生成され

ることを特徴とする請求の範囲第7項～第11項の一つに記載の方法。

13. キレートが $\text{Ni}^{2+}$ イオンで錯生成されることを特徴とする請求の範囲第7項～第12項の一つに記載の方法。

14. 式 $\text{N}\alpha$ ,  $\text{N}\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸のニトリロトリ酢酸誘導体。

15. 金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによりタンパク質及びペプチドを精製するための請求の範囲第14項に記載のニトリロトリ酢酸誘導体の使用。

16. 電磁放射線に透過性であり、かつ異なる屈折率のものである二つの媒体（低い屈折率の媒体は水性媒体である）の界面で金属層中で表面プラズモン共鳴を測定することにより（ポリ）ペプチドと反応パートナーの相互作用を研究するためのバイオセンサーユニットであって、キレート剤（適当な場合、それが金属イオンと錯生成される形態である）が水性媒体に面するバイオセンサーユニットの表面に結合されることを特徴とするバイオセンサーユニット。

17. キレート剤が生体適合性の多孔質マトリックス、特にヒドロゲルの反応性基に結合されることを特徴とする請求の範囲第16項に記載のバイオセンサーユニット。

18. ヒドロゲルが多糖、例えば、デキストラン、アガロース、ヤハズツノマタ、アルギン酸塩、澱粉、セルロースまたはこれらの誘導体、または水膨潤性有機ポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドもしくはポリエチレングリコールを含む群から選ばれることを特徴とする請求の範囲第17項に記載のバイオセンサーユニット。

19. ヒドロゲルがデキストランであることを特徴とする請求の範囲第18項に記載のバイオセンサーユニット。

20. デキストランが反応性基としてカルボキシメチル基を有することを特徴とする請求の範囲第19項に記載のバイオセンサーユニット。

21. キレート剤がイミノジ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第16項～第20項の一つに記載のバイオセンサーユニット。

22. キレート剤が一般式 $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$

(式中、Rは型 $(CH_2)_n$ -のアルキレン基(これは置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい)を表してもよく、但し、その置換基がキレート剤

の機能に対して有害な作用を有しないことを条件とし、かつnは整数1、2、3、4、5、6、7、8、9または10を表し、そのアルキレン基が十分に大きい場合には、それはおそらくまた一つ以上のアルケン部分構造またはアルキン部分構造を含んでいてもよく、またはRは芳香族ブリッジ員[これは一つ以上の単核芳香族化合物または多核芳香族化合物(これは必要によりまた芳香族複素環であってもよい)からつくられていてもよい]を表してもよく、またはRはアラルキルブリッジ員(その芳香族部分は直接に、または型 $(CH_2)_n$ - (式中、nは整数1、2、3、4または5を表してもよい)のアルキル基を介してYに結合されていてもよく、またはカルボキシル基に隣接する $\alpha$ -C原子に結合されていてもよく、かつYは反応性基、特に $NH_2$ 基またはSH基である)

のニトリロトリ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第21項に記載のバイオセンサーユニット。

23. ニトリロトリ酢酸誘導体がN-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸であることを特徴とする請求の範囲第22項に記載のバイオセンサーユニット。

24. (ポリ)ペプチドが少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドを有し、かつキレート剤が一般式 $Y-R_1-CH(COOH)-N(R_2CHCOOH)_2$

(式中、R<sub>1</sub>は請求の範囲第8項にRについて示された意味を有する基であり、かつR<sub>2</sub>は型 $CH_3(CH_2)_n$ - (これは置換されていてもよく、または置換されていなくてもよく、かつnは整数1、2、3、4または5を表してもよい)のアルキル基であってもよく、またはR<sub>2</sub>は分岐アルキル基、例えば、イソプロピル、t-ブチルまたはイソブチルであってもよく、またはR<sub>2</sub>は請求の範囲第8項にRについて定義された意味を有する芳香族ブリッジ員であってもよく、かつYは反応性基、特に $NH_2$ 基またはSH基である)

のニトリロトリ酢酸誘導体であることを特徴とする請求の範囲第21項に記載のバ

イオセンサーユニット。

25. ニトリロトリ酢酸誘導体が $N\alpha$ ,  $N\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2,6-ジアミノヘキサン酸であることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のバイオセンサーユニット。

26. SPRを使用して反応パートナーとの(ポリ)ペプチドの相互作用の研究用のバイオセンサーキットであって、そのキットが第一容器中のSPRバイオセンサーユニット、別の容器中のキレート剤、別の容器中のキレート剤で錯生成するのに適している金属の塩、一つ以上の付加的な容器中のバイオセンサーの表面を活性化するための試薬、適当な場合には別の容器中のその表面を失活するための試薬、適当な場合には別の容器中のその表面を再生するための試薬、そしてまた、適当な場合には一つ以上の付加的な容器中の一種以上の比較タンパク質を含むバイオセンサーキット。

**【発明の詳細な説明】****表面プラズモン共鳴を使用する生物分子の相互作用の研究方法**

本発明は分子の生物特異性相互作用の研究に関する。

従来、巨大分子の分子間相互作用、例えば、(ポリ)ペプチド(ポリ)ペプチド相互作用または(ポリ)ペプチド-DNA相互作用の分析は一般に平衡条件下で行われていた。最近まで、二三の例外はあるが、速度論パラメーターを研究することは可能ではなく、またはかろうじて可能であるにすぎなかった。何となれば、これらの研究は巨大分子が比較的多量で、しかも比較的高純度で存在することを必要としたからであり、かつ／またはアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫学的方法の如き利用可能な方法が生物特異性相互作用を監視するのに十分に迅速ではなかったからである。

表面プラズモン共鳴、SPRの光現象に基く方法が最近開発された。生物特異性界面の屈折率の変化に相関関係があり、また巨大分子の濃度の変化と関連して得られ、その変化が、例えば、互いに結合する反応パートナーにより励起される光シグナルの評価は、現在この分析をリアルタイムで行うことを可能にする。この方法において、少量の巨大分子（これらは放射能標識または蛍光標識を有しない）が使用でき、それ程厳しくない要求が巨大分子の純度に課せられている。この方法が、とりわけ、PCT出願WO 90/05295及びWO 90/05303に開示されていた。

表面プラズモン共鳴方法に基く最も広く使用されている市販の系(BIACore™, Pharmacia Biosensor)は、光学系及びサンプル輸送装置に加えてその主要素の一つとして所謂バイオセンサーチップの形態のバイオセンサーユニットを有する。バイオセンサーチップは、一面に金の層を有するガラス支持体からなり、その層にカルボキシメチルデキストランを含むヒドロゲルマトリックスがリンカー基を備えているバリアー層により共有結合される。ヒドロゲルマトリックスは、一方では、反応パートナーの一つを固定するのに使用され、また他方では、固定された巨大分子とその反応パートナーの生物特異性相互作用を分析するのに必要とされるミリューを与えるために使用される(Stenbergら, 1991)。

下記の方法が反応パートナーの一つ（これはヒドロゲルマトリックスに関して

一般には（ポリ）ペプチドである）を固定するのに今までのところ使用されていた。

1) 化学方法を使用するバイオセンサーチップのヒドロゲル表面における直接の不可逆的固定化、

2) ヒドロゲルに結合されているストレプトアビジンまたはアビジンに関するビオチニル化反応パートナーの直接の不可逆的固定化、及び

3) ヒドロゲルに結合されている抗体により反応パートナーを結合することによる間接の可逆的固定化。

しかしながら、これらの方法は種々の欠点を示す。方法1)はヒドロゲル形成性物質と（ポリ）ペプチドの方向性のない化学反応（その反応は使用される方法に応じて（ポリ）ペプチドの一级アミノ基、炭水化物基または遊離チオール基で優先的に起こる）のために、（ポリ）ペプチドの生物学的性質及び／または生物物理学的性質が特定し得ないか、またはかろうじて特定できる様式で影響されるというリスクに問題がある。この結果として、固定された（ポリ）ペプチドはその自然のままの生物活性形態ではなく、または完全にはその形態ではない。何となれば、例えば、反応パートナーと相互作用すべきである分子の領域が化学基によりブロックされ、またはその分子中のコンホメーション変化のために接近できなくなったからである。巨大分子をビオチニル化するのに使用される方法は（ポリ）ペプチドをカップリングするための方法と基本的に似ているので、これらの欠点、ひいては方法論的制限がまた2)に記載された方法に当てはまる。両方の方法は、ヒドロゲル表面を再生する能力が同（ポリ）ペプチドを使用して連続的分析を行う時にその方法のかなりの簡素化を構成するが、生物活性及び生物物理的活性を保持しながらこの再生を行うことが非常に困難であるという付加的な欠点を問題にしている。

原理上同じ方法がサンドイッチイムノアッセイ、例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)技術のように使用される時、これらの欠点は抗体を使用することにより回避し得る（方法3）。しかしながら、この方法の使用は（ポリ）ペプチドに特異性である利用可能な高アフィニティーモノクローナル抗体を有する必要により制限される。更なる制限は、抗体が研究すべき反応パートナーとの相互作用



用に重要であるエピトープと相互作用すべきではないことである。

本発明の基礎となる目的は、SPRを使用し、かつ既知の方法の欠点を問題としない、(ポリ)ペプチドと反応パートナーの相互作用の研究方法を提供することであった。

種々の方法が遺伝子方法を使用してタンパク質を調製するのに利用でき、その配列がリガンドに対し高アフィニティーを示す配列セグメント(所謂アフィニティーペプチド)を有する融合タンパク質として解明される。固定金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)は、タンパク質及びペプチドを精製するのに広く使用され、このような融合タンパク質がアフィニティーペプチドにより固定金属キレートに結合される方法である。イミノジ酢酸誘導体のグループからの種々のキレート剤のうち、ニトリロトリ酢酸誘導体が或る金属イオン、例えば、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ または $\text{Zn}^{2+}$ に対する極めて高いアフィニティーを含む特に有利な性質を示す。従来、この方法は、少なくとも一つのヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドが直接または間接に結合される組換え融合タンパク質を精製するために、金属イオンとしてニッケルを使用し、また錯生成剤としてニトリロトリ酢酸を使用して、広く適用されていた。組換えタンパク質を精製するためのこの種の方法が、とりわけ、欧州特許出願第184355号(イミノジ酢酸が錯生成剤として使用される)及び同第282042号(これはニトリロトリ酢酸及び少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を有するアフィニティーペプチドを有するタンパク質を記載する)に開示されていた。

SPR方法における金属キレートアフィニティークロマトグラフィーの原理を利用する概念が、本発明の目的を達成するための基礎を形成した。

それ故、本発明は、相互作用により励起される表面プラズモン共鳴が電磁放射線に透過性であり、かつ異なる屈折率のものである二つの媒体の界面で金属層中で測定され、低い屈折率の媒体が水性媒体であり、その中に(ポリ)ペプチドが固定形態で存在し、反応パートナーと接触される、バイオセンサーユニットを使用する(ポリ)ペプチドと反応パートナーの相互作用の研究方法に関する。

その方法は、(ポリ)ペプチドが金属キレートにより固定されることを特徴とする。

更なる局面において、本発明は電磁放射線に透過性であり、かつ異なる屈折率のものである二つの媒体（低い屈折率の媒体は水性媒体である）の界面で金属層中で表面プラズモン共鳴を測定することにより（ポリ）ペプチドと反応パートナーの相互作用を研究するためのバイオセンサーユニットに関する。そのバイオセンサーユニットは、キレート剤（適当な場合、それが金属イオンと錯生成される形態である）が水性媒体に面するバイオセンサーユニットの表面に結合されることを特徴とする。

好ましい局面において、水相は生体適合性の多孔質マトリックス、特にヒドロゲルである。原則として、ヒドロゲル形成剤の性質に関して制限はない。但し、それらが、特にヒドロゲルマトリックス中の生物分子の必要な拡散に関して、SPR方法に使用するのに基本的に適していることを条件とする。好適なヒドロゲル形成剤の例は多糖、例えば、アガロース、デキストラン、ヤハズツノマタ (carrageen)、アルギン酸塩、澱粉もしくはセルロース、またはこれらの多糖の誘導体、例えば、カルボキシメチル誘導体、または水膨潤性有機ポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドもしくはポリエチレングリコールである。

特に好適なヒドロゲルはデキストランからなるヒドロゲルであり、これは（ポリ）ペプチドの共有結合に関して、反応性基、例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、カルボニル基、エポキシ基またはビニル基を備えている。ヒドロゲル層の設計及び金属層へのその結合（これは適当な場合に有機バリアー層により行われる）が、とりわけ、PCT出願WO 90/05303に記載されているだけでなく、Lofas及びJohnsson, 1990により記載されていた。本発明の好ましい実施態様において、キレート剤はヒドロゲルの反応性基に結合される。

特に好ましい実施態様において、ヒドロゲル形成剤は反応性基としてカルボキシメチル基を有するデキストランである。

付加的な好ましい実施態様において、（ポリ）ペプチドは、その生物活性セグメントに加えて、少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を含むアフィニティーペプチドを有する。この場合、キレート剤は一般式 $Y-R-CH(COOH)-N(CH_2COOH)_2$ のニ

トリロトリ酢酸(NTA)誘導体であり、式中、Rは型 $(CH_2)_n$ -のアルキレンブリッジ（これは置換されていてもよく、または置換されていなくてもよい）を表してもよく、但し、その置換基はキレート剤の機能に対して有害な作用を有しないことを条件とし、nは整数1、2、3、4、5、6、7、8、9または10を表し、そのアルキレン基が十分に大きい場合には、それはまたおそらく一つ以上のアルケン部分構造またはアルキン部分構造を含んでいてもよく、またはRは芳香族ブリッジ員〔これは一つ以上の単核芳香族化合物または多核芳香族化合物（これは必要によりまた芳香族複素環であってもよい）からつくられていてもよい〕を表してもよく、またはRはアラルキルブリッジ員（その芳香族部分は直接に、または型 $(CH_2)_n$ -（式中、nは整数1、2、3、4または5を表してもよい）のアルキル基を介してYに結合されていてもよく、またはカルボキシル基に隣接する $\alpha$ -C原子に結合されていてもよく、かつYは反応性基、特に $NH_2$ 基またはSH基である。

Rの例として、メチレン、エチレン、n-プロピレンもしくはイソプロピレン及びo-、m-、p-フェニレンまたは $\beta$ 、 $\beta'$ -ナフタレンが挙げられる。

また、NTA誘導体は一般式 $Y-R_1-CH(COOH)-N(CHR_2COOH)_2$ を有していてもよく、式中、R<sub>1</sub>はRについて示された意味を有する基を表してもよく、かつR<sub>2</sub>は型 $CH_3(CH_2)_n$ -（これは、例えば、OHもしくはClで置換されていてもよく、または置換されていなくてもよく、かつnは整数1、2、3、4または5を表してもよい）のアルキル基であってもよく、またはR<sub>2</sub>は分岐アルキル基、例えば、イソプロピル、t-ブチルまたはイソブチルであってもよく、またはR<sub>2</sub>はRについて示された意味を有する芳香族ブリッジ員であってもよく、かつYは反応性基、特に $NH_2$ 基またはSH基である。

RまたはR<sub>1</sub>は、一方では、錯生成能が、未結合NTAの錯生成能と較べて、できるだけ少なく影響されるように、他方では、バイオセンサーユニットの表面までの距離がSPR現象に干渉しない程十分に小さいように選択される。

R<sub>2</sub>はキレート化すべき金属イオン及び研究すべき物質と錯生成するキレート剤の能力が悪影響されないように選択される。

置換基RもしくはR<sub>1</sub>またはR<sub>2</sub>の適性は、例えば、好適なりガンド、一般にHis

(6)-修飾ポリペプチドを使用する結合研究により試験し得る。錯生成能に悪影響する置換基はリガンドのアフィニティーを低下する。そのリガンドの非特異的結合に影響する置換基は陽イオンで錯生成されないキレート剤のためのリガンドの結合を増大する。Yはキレート剤がバイオセンサーユニットの表面、特にヒドロゲルマトリックス中に含まれる反応性基に結合される反応性基である。それ故、キレート剤の反応性基はバイオセンサーユニット、特にヒドロゲルマトリックスの表面の反応性基にかみ合わされる。特に、反応性基Yはデキストランの修飾カルボキシメチル基に結合するNH<sub>2</sub>基であることが好ましい。共有結合に適しているその他のY反応性基は安定なチオエーテル基に変換し得るSH基である。このチオエーテル結合は還元剤、例えば、メルカプトエタノール（これは（ポリ）ペプチドを精製または合成するのに頻繁に使用される）の存在下の安定性に関してジスルフィド結合より優れている。

キレート剤は（ポリ）ペプチドをカップリングするのに知られている方法を使用して、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)及びN-エチル-N'-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)（例えば、Cuatrecasas及びParikh, 1972を参照のこと）を使用してその反応性基によりヒドロゲルに結合し得る。

本発明の範囲内で好適であるキレート剤が米国特許第4,877,830号、EP-A-253303及びWO 90/12803そしてまたHochuli及びPiesecki, 1992、及びYokoyamaら, 1993の論文に記載されていた。遷移金属イオン、好ましくは第四周期の遷移金属イオンが金属イオンとして特に好ましい。マンガンイオン、コバルトイオン、ニッケルイオンまたは銅イオンが特に好ましく、特にNi<sup>2+</sup>が好ましい。

本発明の範囲内で、N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸（これはHochuliら, 1987により記載されていた）、そしてまたN $\alpha$ , N $\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2,6-ジアミノヘキサン酸がNTA誘導体として特に好ましく、またニッケルがそれで錯生成される金属イオンとして特に好ましい。

融合（ポリ）ペプチド〔これは好ましい金属キレートに結合するそれらの能力

を確実にするために少なくとも二つの隣接ヒスチジン残基を示し、これらは本発

明のためにその好ましい実施態様(所謂“His-Tagタンパク質”)に使用される]の調製に関して、欧州特許出願EP-A-282 042が参照にされる。このようなHis-Tagタンパク質の例は、アフィニティーペプチドが互いに並んで6ヒスチジン残基を有する(His)6-タンパク質である。

原則として、キレート剤を適当な場合には反応性基を有する有機バリアー層によりバイオセンサーチップの金属表面に直接にカップリングすることがまた可能である。このようなバリアー層に関して、WO 90/05303の開示が参考にされる。しかしながら、(ポリ)ペプチドを主としてヒドロゲルマトリックスに固定することが一般に好ましい。何となれば、マトリックスの構造は細胞の内部中の生理条件に非常に良く合致し、それにより生物分子の相互作用を研究するための自然環境に近づくからである。

本発明は、バイオセンサー表面が完全に再生できるという重要な利点を有する。これは匹敵する条件下で連続実験を行うことを可能にする。新規バイオセンサーユニットは再生に課せられる下記の要件を満足する。

- 1) 金属キレートに結合される(ポリ)ペプチドが完全に除去し得る。
- 2) 更に負荷(load)の際に、バイオセンサーユニットの表面が固定される(ポリ)ペプチドを結合するためのキャパシティを失わない。
- 3) 固定された(ポリ)ペプチドの結合特性が影響されない。

幾つかの選択がリガンド、例えば、His(6)タンパク質を結合した金属イオン飽和キレート表面を再生するのに利用できる。一方では、リガンドは殆どの部分が安定に留まるために、使用される金属イオンに応じて、酸処理(例えば、10mMの酢酸)、金属イオン負荷により除去し得る。必要により、結合されたタンパク質は、別の強いキレート剤、例えば、100mMのEDTAを添加することにより、固定されたキレート結合から金属イオンと一緒に除去し得る。金属イオンがキレート剤に結合される安定性は夫々個々の場合に測定される必要があり、とりわけ、リガンド/金属イオン錯体の安定性に依存する。方法の再現性が考慮される場合、その他のキレート剤を使用してキレート表面を再生する方法が第一の方法に好まし

い。

また、サンドイッチ状表面、例えば、金属キレートーリガンド1ーリガンド2

(この場合、リガンド1は金属キレート表面に対し高アフィニティーを有する(ポリ)ペプチドに相当し、またリガンド2は金属キレート表面ではなくリガンド1に対しアフィニティーを有する巨大分子に相当する)の再生が、キレート表面へのリガンド1の結合に影響しないでリガンド2の除去を可能にする条件下で行い得るか否かを夫々個々の場合に試験することが必要である。古典的アフィニティークロマトグラフィーに使用されるような、高い塩濃度を有する溶液が、この目的のために特に使用し得る。

SPR方法の適用の古典的領域に使用されることに加えて、本発明はまた所望のタンパク質を含むフラクションを確かめるために生化学的精製に有利に使用し得る。この方法は、その精度及び速度に関してだけでなく、その簡素化に関して古典的精製方法よりも大いに優れている。

付加的な局面において、本発明はSPRを使用して反応パートナーとの(ポリ)ペプチドの相互作用の研究用のバイオセンサーキットに関する。そのキットは第一容器中のSPRバイオセンサーユニット、別の容器中のキレート剤、別の容器中のキレート剤で錯生成するのに適している金属の塩、一つ以上の付加的な容器中のバイオセンサーユニットの表面を活性化するための試薬、適当な場合には別の容器中のその表面を失活するための試薬、適当な場合には別の容器中のその表面を再生するための試薬、そしてまた、適当な場合には一つ以上の付加的な容器中の一種以上の比較タンパク質を含む。

バイオセンサーユニットの一つの表面はヒドロゲル層からなることが好ましい。適当に、キレート剤は低温凍結溶液の形態であり、その濃度及び緩衝液はバイオセンサーユニットの表面へのカップリングに調整される。ニトリロトリ酢酸誘導体、特にN-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸そしてまたN $\alpha$ , N $\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸が好ましいキレート剤である。

金属塩硫酸ニッケルが、好ましくは表面の所望の負荷の程度に応じて希釈し得

る原液の形態で、好ましい。

バイオセンサーユニットの一つの表面が反応性基を有するヒドロゲル、特にカルボキシメチル化デキストランからなる、本発明の好ましい実施態様において、

バイオセンサー表面を活性化するための試薬はN-ヒドロキシスクシンイミド及びN-エチル-N'-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドであり、これらは低温凍結溶液の形態であることが好ましく、これらは濃度及び緩衝液に関して活性化に適している。好ましい実施態様において、(ポリ)ペプチドをカップリングした後にバイオセンサー表面に残るN-ヒドロキシスクシンイミド基を失活するための試薬はエタノールアミンであり、これは適当な濃度であり、かつ好適な緩衝液中にあり、同様に低温凍結形態であることが好ましい。

バイオセンサー表面を再生するための試薬はキレート剤、特にEDTAであることが好ましい。

必要により付加的な容器中に存在する試験タンパク質は、幾つかのヒスチジン残基を含むアフィニティーペプチドを有することが好ましく、バイオセンサー表面の負荷を試験するのに適している濃度及び緩衝液中の通常の溶液として存在する。

本発明の範囲内で行われた実験において、カップリングは、好ましい実施態様に従ってそしてまた簡素化のために、ヒドロゲルマトリックス中で行われた。何となれば、市販のバイオセンサーユニットそれ自体はデキストランマトリックスを有し、かつこのヒドロゲル層が、再現できる様式で、直接カップリングに必要とされるように、バイオセンサーユニットから除去し得ることがやつのことであることが明らかであるからである。

N-ヒドロキシスクシンイミドを使用するカップリング方法がキレート剤N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸またはN $\alpha$ , N $\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸をバイオセンサーヒドロゲル表面に結合するのに使用された。この方法において、遊離一級アミノ基を含むキレート剤が市販のバイオセンサーユニット(BIACore)の修飾デキストランヒドロゲル表面に共有結合によりカップリングされた。固定化に直接使用し得るニ

トリロトリ酢酸の誘導体がキレート剤として合成された。その誘導体は主として公表された方法(Hochuliら, 1987; 及び欧州特許明細書339389)に従って合成されるが、トリフルオロ酢酸／トリフルオロメタンスルホン酸を使用する酸開裂が、保護基を脱離するために、パラジウム／木炭の存在下の記載された水素化に

代えて、行われたという相違がある。この方法で得られる物質は、それが大きな程度で無機不純物を含まないので、バイオセンサーユニットの表面へのカップリングに直接使用し得る。

キレート剤は、バイオセンサーチップ製造業者により推奨された方法を使用して固定された。固定された量を直接測定することはニトリロトリ酢酸誘導体の低い相対分子量に関連する装置上の制限のために可能ではないので、相対的な量がタンパク質を結合するためのキャパシティを測定することにより間接的に検出された。市販のウシ血清アルブミン(BSA)がこの目的に好適であることがわかった。

試験(ポリ)ペプチドはキレート剤で修飾されたニッケルイオンを含まないバイオセンサーチップ表面に対し非常に低いアフィニティーを有することが確かめられた。修飾された表面への(ポリ)ペプチドの結合を観察することは可能ではなかった。試験タンパク質に結合する表面のキャパシティは、実施例4に示されるように、負荷に使用されるニッケルイオン濃度と直接に相関関係がある。ニッケルイオン濃度を調節することにより、結合キャパシティは実験要件に容易に適合し得る。

付加的な局面において、本発明は式  $N\alpha$ ,  $N\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸のニトリロトリ酢酸誘導体に関する。また、このキレート剤は、既知ニトリロトリ酢酸誘導体のように、タンパク質及びペプチドを精製するための固定された金属キレートアフィニティークロマトグラフィーに使用し得る。

図面の表:

図1: バイオセンサーユニットのデキストラン表面上のN-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸の固定化



図2：ウシ血清アルブミンを使用するN-（5-アミノ-1-カルボキシペンチル）イミノジ酢酸によるデキストラン表面の負荷の間接的な測定

図3：EDTAを使用するウシ血清アルブミン負荷バイオセンサー表面の再生

図4：バイオセンサー表面へのタンパク質の非特異的結合の測定

図5：タンパク質をバイオセンサー表面に結合する能力に関するニッケル濃度の効果の測定

図6：N-（5-アミノ-1-カルボキシペンチル）イミノジ酢酸/ $\text{Ni}^{2+}$ で負荷されているバイオセンサー表面に種々のタンパク質を結合する能力

図7： $\text{N}\alpha$ ,  $\text{N}\alpha$ -ジ（1-カルボキシエチル）-2, 6-ジアミノヘキサン酸で負荷されているバイオセンサー表面へのHis(6)-修飾タンパク質の結合

本発明が以下の実施例を使用して説明される。

#### 実施例1

##### a) N-（5-アミノ-1-カルボキシペンチル）イミノジ酢酸の合成

ブロモ酢酸(Aldrich) 4.17gを2MのNaOH15mlに溶解し、その溶液を0℃に冷却した。2MのNaOH22.5ml中のN $\epsilon$ -ベンジルオキシカルボニル-L-リシン(Fluka) 4.2gの溶液を攪拌しながらこの溶液に徐々に添加した。2時間後、その溶液を室温に温め、次いで一夜攪拌した。続いて、その溶液を50℃で2時間加熱し、その後1MのHCl 45mlを徐々にそれに添加した。得られる沈殿を遠心分離して除き、0.1MのHClで洗浄し、乾燥させた（生成物5g、理論収量5.9g）。先に得られた誘導体0.87gをトリフルオロ酢酸(Merck) 10mlに溶解した。トリフルオロメタンスルホン酸(Merck) 1mlをその透明溶液に徐々に添加し、これを氷で冷却し、次いでこの混合物を室温で1時間攪拌した。生成した沈殿を分離して除き、水30mlをその溶液に添加し、これを殆ど乾燥するまで濃縮した。溶離剤として水を使用してこの溶液のアリコートを手動でPD10カラム(Pharmacia)で分別した。ニンヒドリン陽性の中性フラクションを合わせ、凍結乾燥した。

##### b) $\text{N}\alpha$ , $\text{N}\alpha$ -ジ（1-カルボキシエチル）-2, 6-ジアミノヘキサン酸の合成

2-ブロモプロピオン酸(35ミリモル) 5.35gを2MのNaOH15mlに溶解し、この溶

液を0℃に冷却した。2MのNaOH22.5ml中のNε-ベンジルオキシカルボニル-L-リシン(15ミリモル)4.2gの溶液を室温で攪拌しながらこの溶液に徐々に滴下して添加し、得られる混合物を70℃で一夜攪拌した。それを冷却した後、1MのHCl45mlをその溶液に徐々に添加した。沈殿を遠心分離して除き、0.1MのHClで洗浄し、乾燥させた。Z保護基を脱離するために、沈殿を最小量のトリフルオロ酢酸に溶解し、0.1倍の容積のトリフルオロメタンスルホン酸を氷で冷却しながら滴下して添加した。室温で1.5時間攪拌した後、その溶液を10倍の容積のジエチル

エーテルに滴下して添加した。沈殿をエーテルで3回洗浄し、乾燥させた。生成した沈殿を分離して除き、水30mlをその溶液に添加し、これを殆ど乾燥するまで濃縮した。溶離剤として水を使用してこの溶液のアリコートにPD10カラム(Pharmacia)で分別した。ニンヒドリン陽性の中性フラクションを合わせ、凍結乾燥した。その化合物の同定をプロトン-NMR分析により確認した。

## 実施例2

SPRバイオセンサーユニットのデキストラン表面へのN-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸のカップリング

固定化の工程の全てを、HBS緩衝液(10mMのHEPES(2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジノ]-エタンスルホン酸)、150mMのNaCl及び5mMのMgCl<sub>2</sub>、pH7.4)を使用してBIACore装置(Pharmacia)中で25℃で行った。

CM5バイオセンサーチップ(Pharmaciaバイオセンサー、保証グレード)を固定化に使用した(このバイオセンサーユニットはカルボキシメチル化デキストランを含むヒドロゲル表面を有する)。0.05MのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)/0.2MのN-エチル-N'-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)溶液(流量5μl/分)35μlを注入することによりヒドロゲル表面を活性化した。N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸(これは実施例1に記載されている)を活性化された表面にカップリングするために、1MのNaOH中の15mg/mlのN-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸の溶液35μlを3μl/分の流量で注入した。エタノールアミンの1Mの溶液(pH8.5)(流量5μl/分)35μlを注入することにより、表面の飽和されていない結合部位

を飽和させた。表面を状態調整するために、EDTA (NaOHでpH 8に調節した) の10 mMの溶液10  $\mu$ lを注入し、その表面を0.1MのNiSO<sub>4</sub>/0.2MのCH<sub>3</sub>-COONa溶液 (流量 5  $\mu$ l/分) 4  $\mu$ lで負荷した。この固定化の過程を表面プラズモン共鳴の変化に関して図 1 に示す。固定化の個々の工程をその図に示す。キレート剤による表面の負荷はその薬剤の低い相対分子量 (Mr 295) のために直接測定し得ないので、運転緩衝液100ml中ウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) 1gの溶液35  $\mu$ lを一定の流量 (5  $\mu$ l/分) で注入することによりその負荷を間接的に測定した。センサーグラム (図 2) は表面へのそのタンパク質の有意な結合を示す。表面図

定化の再現性を、このタンパク質の標準化溶液を使用して連続実験により確認した。

### 実施例 3

N- (5-アミノ-1-カルボキシペンチル) イミノジ酢酸表面の再生可能性

N- (5-アミノ-1-カルボキシペンチル) イミノジ酢酸表面の再生可能性を調べるために、下記の操作の順序を実施例 2 に記載されたようにして一定の流量 (5  $\mu$ l/分) で連続して20回行った。Ni<sup>2+</sup>イオンで負荷し、次いで運転緩衝液100ml中のウシ血清アルブミン (BSA, Sigma) 1gの溶液35  $\mu$ lで注入し、次いでEDTA (エチレンジアミン-N, N, N', N'-テトラ酢酸) で再生した。図 3 に示されたデータ (基準線、注入最大及び結合されたタンパク質  $t = 1$ ) を計算するために、共鳴をウシ血清アルブミンの注入の30秒前 (基準線)、ウシ血清アルブミン注入の終了の30秒前 (注入最大) そしてウシ血清アルブミン注入の30秒後 (結合されたタンパク質  $t = 1$ ) に測定した。

EDTA (100mM、pH 8) が結合されたタンパク質を除去するのに最適な試薬であることがわかった。図 3 が示すように、その後の負荷 (注入最大、結合されたタンパク質  $t = 1$ ) に関する表面の活性の損失または再生後の結合されたタンパク質の保持 (基準線) を観察することは可能ではない。EDTAはキレート結合されたニッケルイオンを除去するので、Ni<sup>2+</sup>イオンによる負荷は、表面が再生された後にもう一度行われる必要がある。

### 実施例 4

### タンパク質を結合する能力に関する $\text{Ni}^{2+}$ の濃度の効果

表面へのタンパク質の非特異的結合を測定するために、実施例1に記載された表面を実施例3に記載されたようにしてEDTAで再生し、試験タンパク質の溶液20  $\mu\text{l}$ を5  $\mu\text{l}/\text{分}$ の流量で注入した。表面をEDTAでもう一度再生し、4  $\mu\text{l}$ の0.1Mの $\text{NiSO}_4/0.2\text{M}$ の $\text{CH}_3\text{-COONa}$ 溶液（流量5  $\mu\text{l}/\text{分}$ ）で負荷した後、試験タンパク質溶液更に20  $\mu\text{l}$ を注入した。図4に示されたように、表面への結合は $\text{Ni}^{2+}$ の不在下で観察し得ない。しかしながら、表面が $\text{Ni}^{2+}$ で負荷された後、それは試験タンパク質で飽和されるようになることが見られる。表面の結合能力に関する $\text{Ni}^{2+}$ 濃度の効果を測定するために、実施例1に記載された $\text{Ni}^{2+}$ -N-（5-アミ

ノ-1-カルボキシペンチル）イミノジ酢酸表面を実施例3に記載されたようにしてEDTAで再生し、夫々の場合に所定の濃度の $\text{Ni}^{2+}$ 溶液（0.1Mの $\text{NiSO}_4/0.2\text{M}$ の $\text{CH}_3\text{-COONa}$ 、流量5  $\mu\text{l}/\text{分}$ ）4  $\mu\text{l}$ で負荷した。ニッケルによる負荷が起こった後に、タンパク質を注入し、 $t = 1$ における共鳴を測定した。ニッケルイオン溶液の濃度に対して測定された共鳴のプロット（図5）は、その表面の完全な負荷が $\text{Ni}^{2+}$ の100  $\mu\text{M}$ の溶液4  $\mu\text{l}$ を使用して得られることを示す。低濃度は表面の不完全な負荷のみをもたらし、その程度は使用された濃度に依存する。

### 実施例5

N-（5-アミノ-1-カルボキシペンチル）イミノジ酢酸表面に結合する異なるタンパク質の能力

異なるタンパク質の異なる結合挙動を調べるために、配列表に示された配列を有するニワトリタンパク質（その配列はHis(6)で修飾されていた）（His)6-SCF）、ウシ血清アルブミン(Sigma)及び卵白リゾチーム(Sigma)の夫々40  $\mu\text{l}$ の容積の溶液を、実施例2に従って合成されたバイオセンサー表面に注入した（ニワトリタンパク質は調製され、市販の発現ベクター [pQE50、Diagen GmbH] 中のその発現後にその系の製造業者により与えられた精製プロトコル [The QIAexpressi-on ist、Diagen GmbH, プロトコル3, p. 35及びプロトコル7, p. 45] に従って精製された）。その更なる精製のために、HQ/M陰イオン交換カラム [Perseptive Biosystems, Freiburg] を使用してタンパク質を精製し、そのタンパク質濃度をブ

ラッドフォードタンパク質アッセイ [BioRad] により測定した。個々のタンパク質の結合挙動を図6に示す。それらの比較的高い濃度にもかかわらず、リゾチーム (Mr 14300) 及びウシ血清アルブミン (Mr 68000) は低い共鳴を示す。対照的に、His(6)-修飾ニワトリタンパク質 (Mr 22000) は表面に何倍も強く結合する。また、His(6)-修飾ニワトリタンパク質とは対照的に、リゾチーム及びウシ血清アルブミンは表面の飽和を達成することがわかる。飽和点までHis(6)-修飾ニワトリタンパク質で負荷された表面は、例えば、ニワトリ細胞系培養液の上澄みからのタンパク質について研究するのに使用でき、これらは異なる細胞系からの細胞培養上澄みを注入することによりこのタンパク質と相互作用する。相互作用パートナーの結合は注入後に起こる共鳴の増幅により検出し得る。

#### 実施例 6

N $\alpha$ , N $\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸表面へのHis(6)-SCFの結合

N $\alpha$ , N $\alpha$ -ジ(1-カルボキシエチル)-2, 6-ジアミノヘキサン酸表面を、N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸について実施例2に記載された条件と正確に同じ条件下で調製した。

この表面に結合する時の(His)6-修飾タンパク質の挙動を調べるために、その表面をNi<sup>2+</sup>イオンで負荷し、配列表に示されたHis(6)-修飾配列(実施例5に記載された(His)6-SCF)を有するニワトリタンパク質の溶液(運転緩衝液中10 $\mu$ g/ml)40 $\mu$ lを5 $\mu$ l/分の流量でこの表面に注入した。そのセンサーグラムを図7に示す。その表面は、N-(5-アミノ-1-カルボキシペンチル)イミノジ酢酸で修飾され、実施例2に記載されている表面の結合挙動に匹敵する結合挙動を示す。表面固定化の再現性を、タンパク質の標準化溶液を使用して連続実験により確認した。

## 引用文献

- Cuatrecasas, P. 及び Parikh, 1972, J. Biochemistry 11, 2291
- Hochuli, E., H. Dobel 及び Schacher, A., 1987, J. Chromatography 411, 177-184
- Hochuli, E. 及び Piessecki, S., 1992, Methods 4 (San Diego), 66-72
- Lofas, S. 及び Johnsson, B., 1990, J. Chem. Soc., Chem. Communications 1526
- Stenberg, E. ら, 1991, L. of Colloid and Interface Science, 143, 513
- Yokoyama, T., Sigeko, A. 及び Masatoshi, K., 1993, Chem. Lett. 2, 383-386

## [配列表]

## (1) 一般情報

## (i) 出願人:

(A) 名称: ベーリンガー インゲルハイム インターナショナルGmbH

(B) 通り: ビンガー シュトラッセ 173

(C) 都市: インゲルハイム アム レイン

(E) 国: FRG

(F) 郵便番号: 55216

(G) 電話番号: 06132/772282

(h) テレファックス: 06132/774377

(ii) 発明の名称: 表面プラズモン共鳴を使用する生物分子の相互作用の研究  
方法

(iii) 配列の数: 1

(iv) コンピュータ読み取り可能形態:

(A) 媒体型: フロッピーディスク

(B) コンピュータ: IBM PC互換機

(C) 操作システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース#1. 0、  
バージョン#1. 25 (EPO)

## (2) 配列番号1の情報

## (i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 204アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(iii) ハイボセティカル: no

## (iv) 起源:

(A) 生物名: ガルス ドメチクス

(G) 細胞型: 繊維芽細胞

(ix)配列の特徴:

(A) 名称/記号: タンパク質

(B) 存在位置: 1. . 204

(xi)配列の記載: 配列番号1:

```

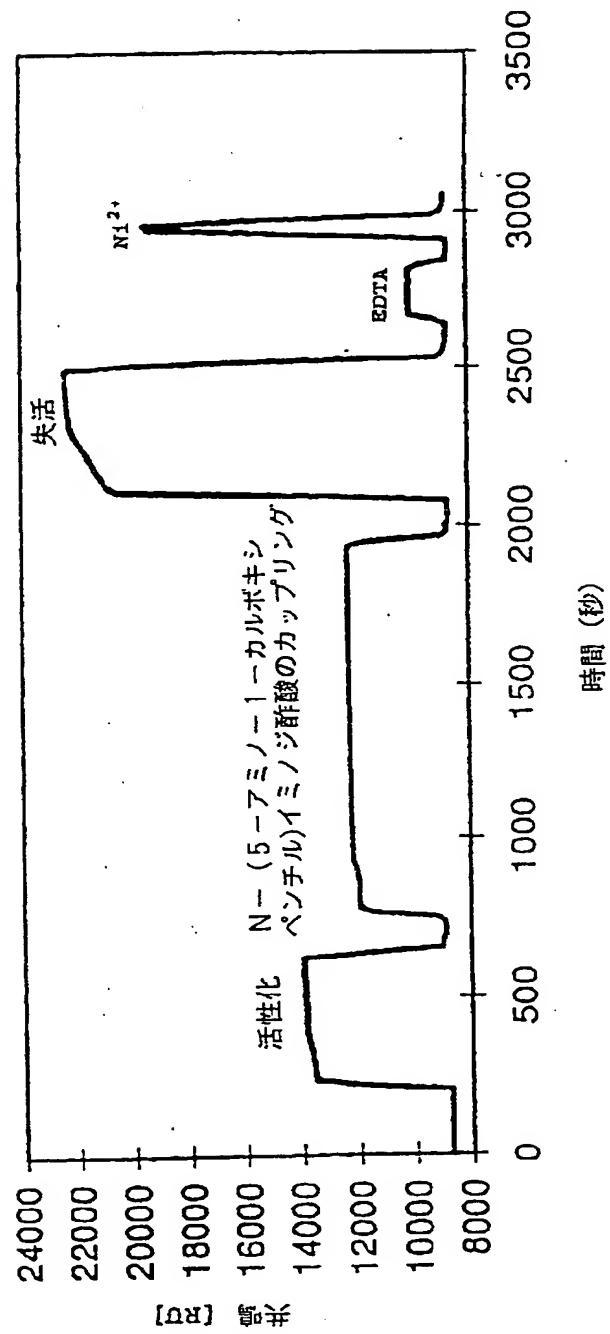
Met Ala Ser His His His His His His Gly Gly Ser Ala Gln Ser Ser
1           5           10           15
Cys Gly Asn Pro Val Thr Asp Asp Val Asn Asp Ile Ala Lys Leu Val
           20           25           30
Gly Asn Leu Pro Asn Asp Tyr Leu Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Lys
           35           40           45
Met Asp Ser Leu Pro Asn His Cys Trp Leu His Leu Met Val Pro Asp
           50           55           60
Phe Ser Arg Ser Leu His Asn Leu Leu Gln Lys Phe Ser Asp Ile Ser
65           70           75           80
Asp Met Ser Asp Val Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Asn Leu Thr
           85           90           95
Arg Ile Ile Asn Asp Leu Met Ala Cys Leu Ala Phe Asp Lys Asn Lys
           100          105          110
Asp Phe Ile Lys Glu Asn Gly His Leu Tyr Glu Glu Asp Arg Phe Ile
           115          120          125
Pro Glu Asn Phe Phe Ser Leu Phe Asn Ser Thr Ile Glu Val Tyr Lys
           130          135          140
Glu Phe Ala Asp Ser Leu Asp Lys Asn Asp Cys Ile Met Pro Ser Thr
145          150          155          160
Val Glu Thr Pro Glu Asn Asp Ser Arg Val Ala Val Thr Lys Thr Ile
           165          170          175
Ser Phe Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ile Gly
           180          185          190
Ser Asn Thr Ser Ser Asn Ser Asn Lys Glu Ala Leu
           195          200

```



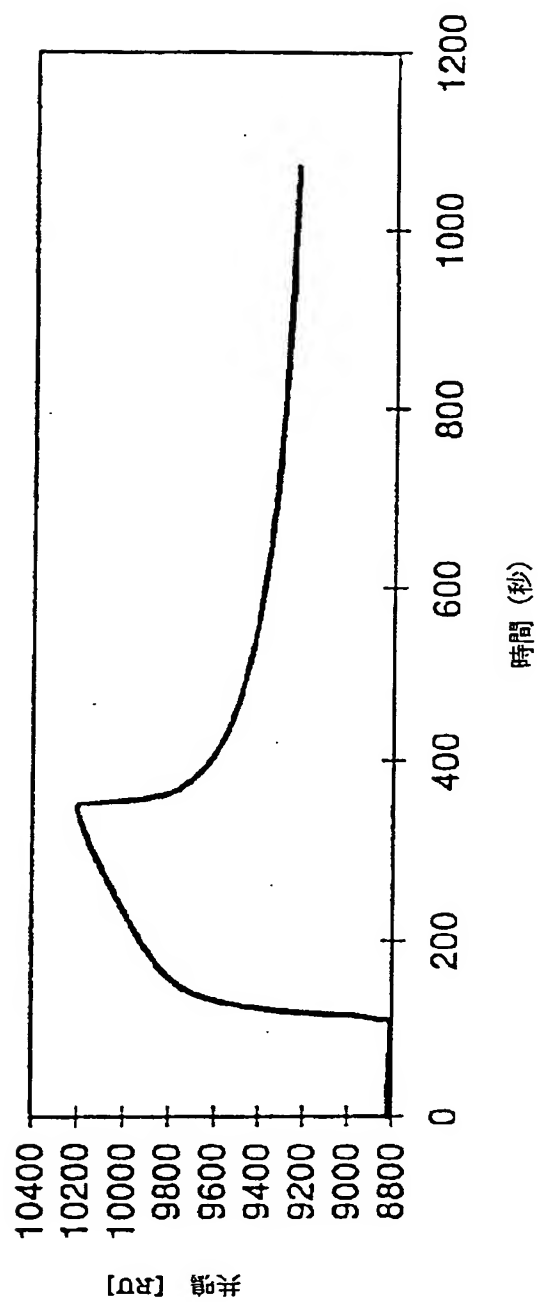
【図1】

Fig. 1



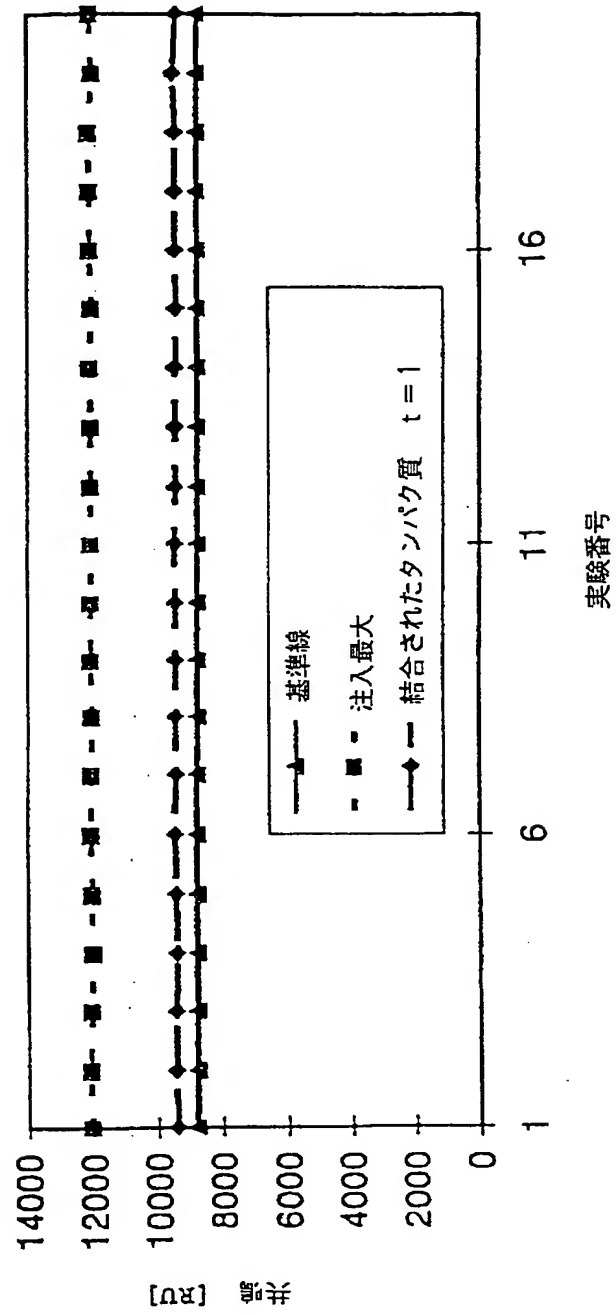
【図2】

Fig. 2



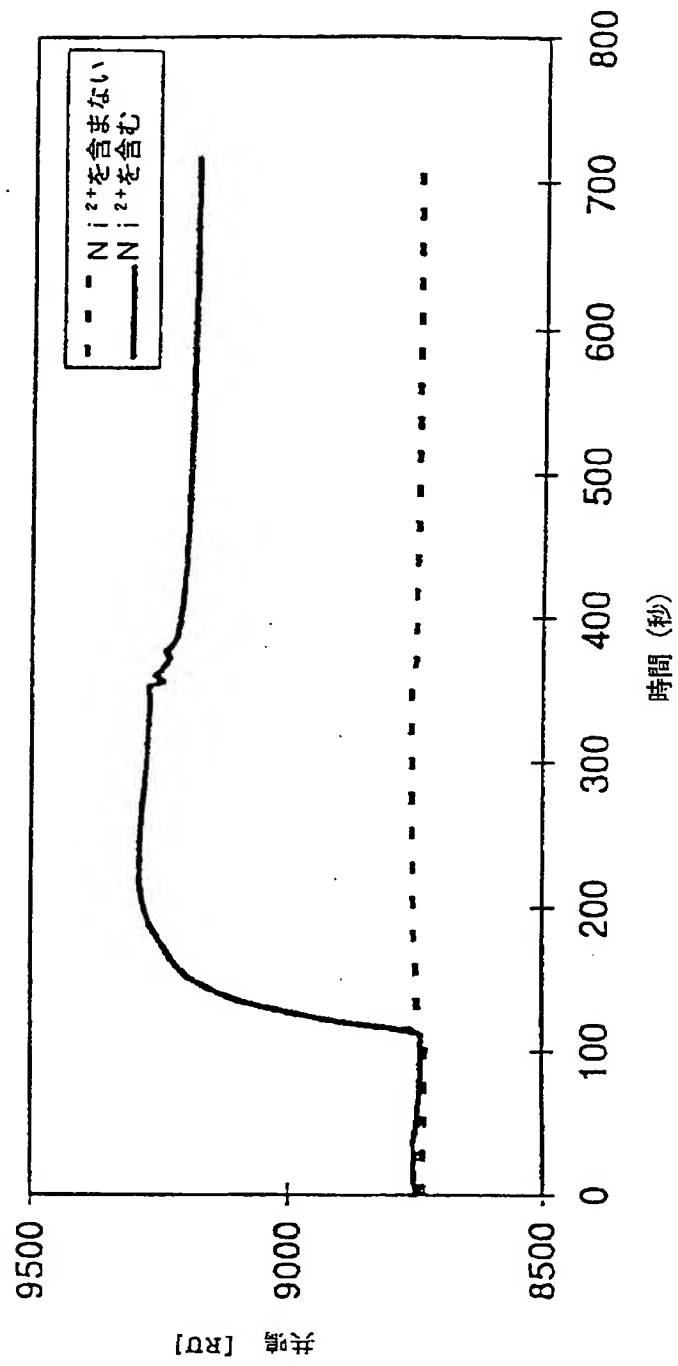
【図3】

Fig. 3



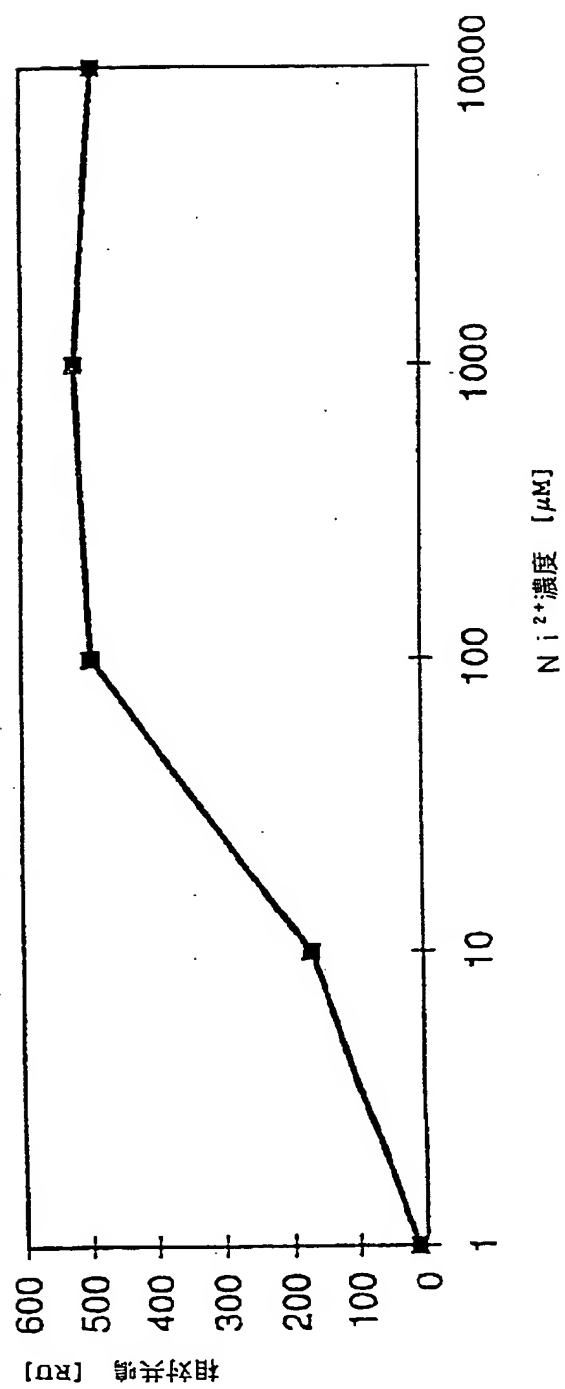
【図4】

Fig. 4



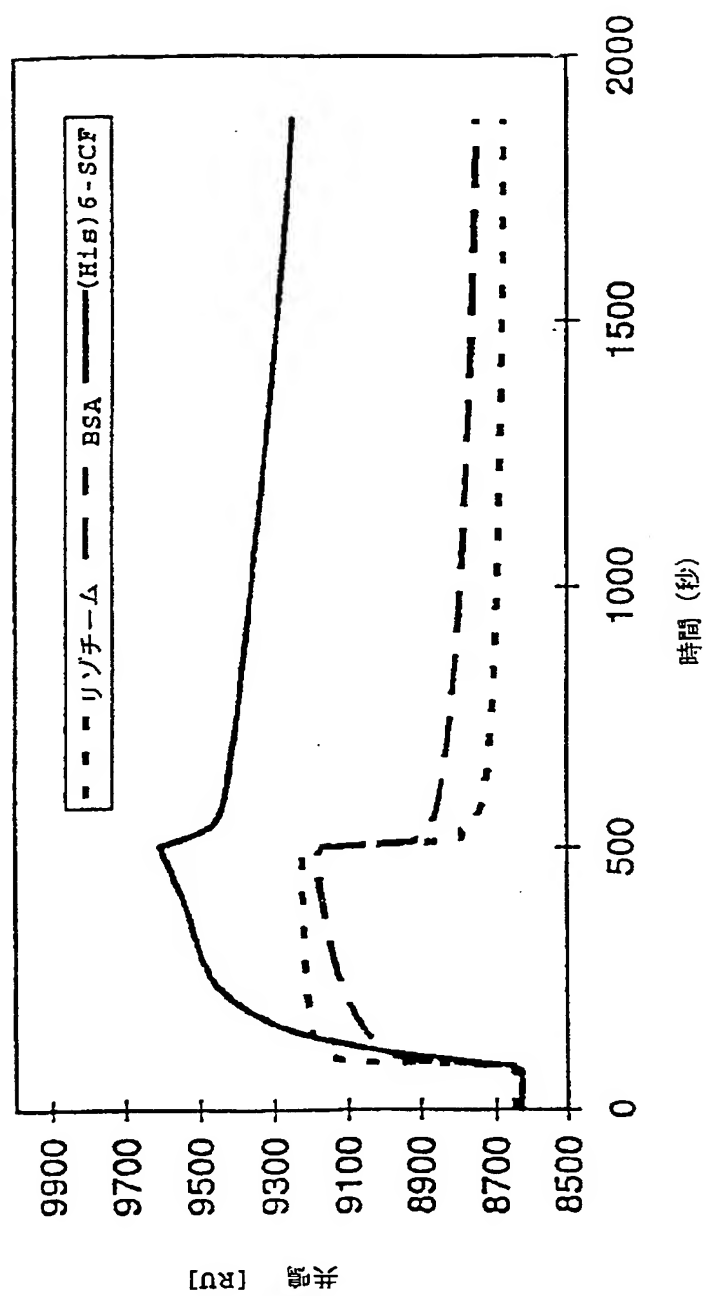
【図5】

Fig. 5



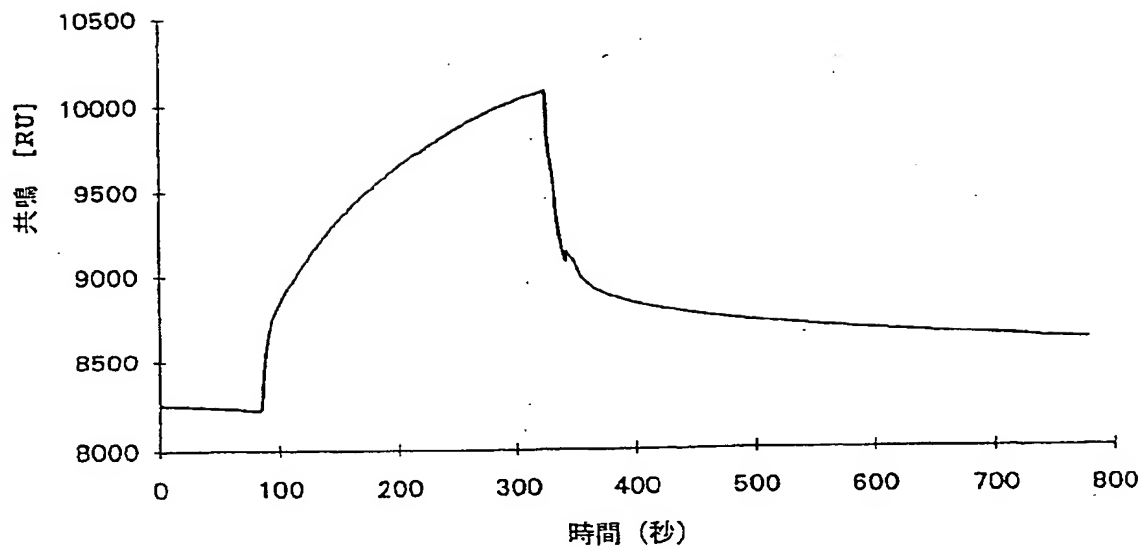
【図6】

Fig. 6



【図7】

Fig. 7



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/543 G01N33/544 G01N33/68 C07C229/26 B01D15/08 G01N21/55		International Application No. PCT/EP 95/03731
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C07C B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 485 874 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 20 May 1992 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,90 05303 (PHARMACIA AB) 17 May 1990 cited in the application see the whole document ---	1-26
Y	EP,A,0 339 389 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2 November 1989 cited in the application see the whole document ---	1-26
Y	EP,A,0 253 303 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG) 20 January 1988 cited in the application see the whole document ---	1-26
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 February 1996		Date of mailing of the international search report 12-03-1996
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Griffith, G



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 95/83731

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 569 794 (M. C. SMITH ET AL.) 11 February 1986 & EP,A,0 184 355 cited in the application ---	
A	EP,A,0 282 042 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG) 14 September 1988 cited in the application ---	
A	WO,A,90 12803 (BIOGEN, INC.) 1 November 1990 cited in the application -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 95/03731

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0485874	20-05-92	CA-A- 2055117 DE-D- 59106527 JP-A- 4268455	15-05-92 26-10-95 24-09-92
WO-A-9005303	17-05-90	SE-B- 462454 EP-A- 0589867 JP-T- 4501605 SE-A- 8804073 US-A- 5436161 US-A- 5242828	25-06-90 06-04-94 19-03-92 10-11-88 25-07-95 07-09-93
EP-A-339389	02-11-89	DE-D- 58905660 JP-A- 1312465 JP-B- 7058294	28-10-93 18-12-89 21-06-95
EP-A-253303	20-01-88	AU-B- 596674 AU-B- 7524587 CA-A- 1304886 CA-A- 1328537 CA-A- 1329215 DE-A- 3779501 IE-B- 60468 JP-A- 63044947 US-A- 4877830 US-A- 5047513 ZA-A- 8704860	10-05-90 14-01-88 07-07-92 12-04-94 03-05-94 09-07-92 13-07-94 25-02-88 31-10-89 10-09-91 11-01-88
US-A-4569794	11-02-86	AU-B- 588840 AU-B- 5024085 CA-A- 1252948 DE-A- 3585147 EP-A,B 0184355 IE-B- 58501 JP-B- 7088400 JP-A- 61148197	28-09-89 12-06-86 18-04-89 20-02-92 11-06-86 06-10-93 27-09-95 05-07-86
EP-A-282042	14-09-88	AT-T- 106897 AU-B- 609783 AU-B- 1270988 DE-D- 3889949	15-06-94 09-05-91 15-09-88 14-07-94

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/03731

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-282042		JP-A- 63251095	18-10-88
		US-A- 5310663	10-05-94
		US-A- 5284933	08-02-94
		ZA-A- 8801534	12-09-88
-----			
W0-A-9012803	01-11-90	US-A- 5169936	08-12-92
		AU-B- 5545790	16-11-90
		EP-A- 0467992	29-01-92
		JP-T- 4504720	20-08-92
-----			

---

フロントページの続き

(72)発明者   ハーバーマン   ピアンカ  
              オーストリア   アー1180   ウィーン   アナ  
              シュタシウス   グリュンガッセ   54-ザ  
              セカンド